

肝実質細胞の増殖を促進する因子の作用機構

薬学部 荻 原 政 彦

1. はじめに

哺乳動物の肝臓は、およそ500種以上の多様な生化学反応を営んでおり、物質代謝の中心的臓器である。さらに、肝臓には、外科的部分切除や、化学物質による肝障害に応答して自己増殖を行う能力が備わっている。これを肝再生 (liver regeneration) という。肝再生現象のメカニズムの解明は、生命科学に興味をもつ者にとって大変魅力的な研究テーマであり、古来より多くの研究が行なわれてきた。

最近、我々は、初代培養肝細胞実験系において、従来の報告よりもかなり早期に肝実質細胞が分裂・増殖を開始することを見出した。そこで、本論文では、(1)肝臓の仕組みと働き、(2)肝再生現象、(3)肝実質細胞の初代培養について概説したうえで、我々の実験結果について述べ、その生理学的意義について考察することにしたい。

2. 肝臓の仕組みと働き

肝臓は、約3000億個の肝細胞（肝実質細胞、クッパー細胞、伊東細胞、線維芽細胞など）、血管系（固有肝動脈、門脈、肝静脈）および胆管より成っており、体内の臓器の中で最大である。肝臓は、肝中心静脈を中心として、肝実質細胞が放射状および索状に並ぶ構造をとっている。この肝小葉構造により、物質代謝が効率よく行なわれている。そのおもな働きは、生体のホメオスタシスを維持することにあるということができる。すなわち、(1)血糖調節と脂質およびタンパク質代謝、(2)血中タンパク（アルブミンや血液凝固因子）の合成、(3)胆汁酸の合成と分泌、(4)毒化合物の分解反応などを営んでいる。肝臓の示すこれらの機能の大部分は、肝臓全体の細胞数の約70%および湿重量で約90%を占める肝実質細胞が担っている。これらの代謝過程は、ホルモン、自律神経、成長因子などにより功妙な調節を受けている。

3. 肝再生現象

成熟した哺乳動物の肝臓は、通常は細胞周期でいう静止期 (G0) にあり、増殖反応を停止していて、いわゆる分化機能（肝特異機能）を営んでいる。しかし、先述したように、肝臓の約2/3を外科的に除去したり、四塩化炭素のような化学物質を投与して肝障害（肝細胞の壊死）を誘発させた場合、残余の肝細胞は、増殖 (proliferation) を開始する。この増殖は、際限なく続くのではなく、およそ10日間（ラットの場合）の日数経過でもとの容積にまでなり、この反応は自動的に停止する。この劇的な肝再生過程は、ギリシャ神話にもそれらしい記載があることから、人類はかなり昔から

経験的に知っていたようである¹⁻³⁾。

肝再生現象が、しかし、科学的方法で証明されるには、20世紀の始めまで待たなければならなかった。その後の研究で、肝細胞の増殖の引き金を引く物質は、液性因子であることが、体液交流実験 (parabiosis) によって示された。さらにその後の研究で、多くの成長因子やサイトカインが肝再生中の動物の血液中や組織中から単離され、精製された。そして、これらの因子を利用して、肝再生の開始と終了の分子機構の研究が進められ、最近ようやくその実態が少しずつ明らかになってきた。図1には、肝再生現象の主役である肝実質細胞の増殖に影響を与える因子の作用に関する模式図を示した。

4. 肝実質細胞の初代培養

丸ごとの動物を用いる in vivo の実験系で、肝再生現象の分子機構を研究するには、関与する要素 (因子) が多すぎて、実験結果から一定の結論を引き出すことには大きな困難をともなう場合が多い。しかし、1969年に、画期的な方法論上の進歩がもたらされた。すなわち、Berry と Friend が、成熟ラットの肝臓をコラゲナーゼとヒアルロニダーゼを含む溶液で還流することにより、無傷でかつ元気のよい状態の肝実質細胞 (生存率90%以上) を分散させることに成功したのである⁵⁾。さらに、Seglen らは、この方法を詳しく検討し改良を加えた⁶⁾。

この単離・精製した肝実質細胞を培養皿上で単層培養することにより、これを初代培養 (primary culture) というが、in vivo における肝臓にほぼ匹敵する多様な肝機能を長時間維持させることが可能となった。初代培養肝細胞は、種々のホルモンや成長因子に対する応答能をも保持しており、肝臓の働きに関する多くの分野の研究に広く利用されることとなった。特記すべき事項として、1980年代に入って長らく困難であった初代培養成熟肝実質細胞を増殖させることが、技術的に可能となったことがあげられる^{7,8)}。つまり、初代培養肝細胞実験系は、in vivo の実験系の複雑さを回

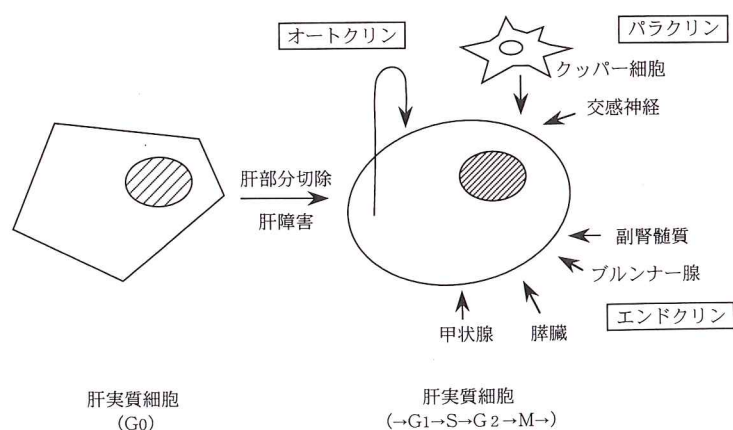


図1 肝実質細胞の増殖に影響をおよぼす因子

避できるより単純なモデル実験系であることから、肝実質細胞が増殖を開始あるいは停止する条件とその分子機構を詳しく検討することが可能となったのである。我々も1990年代からこの実験系を改良しつつ、肝実質細胞の増殖メカニズムを研究してきたので、その結果の一端を以下に紹介したい。

5. 実験方法

5-1) 肝実質細胞の単離と培養

ウィスター系雄性ラット（体重200~220 g）にペントバルビタール麻酔を施し、開腹後、肝臓をコラゲナーゼ溶液で還流した。肝実質細胞を分散し低速遠心（50 g × 1 min）を3回くり返し、精製して非実質細胞をほとんど含まないほぼ均一な細胞集団を得た。これを牛血清を含むウィリアムスE培地にけん濁させ、通常は、 3.3×10^4 個/cm²の密度で、コラーゲンコートしたプラスチック培養皿に播種した。肝実質細胞を37°C、3時間CO₂インキュベータ内で培養し、細胞をディッシュの底面に接着させた後、培養液を上皮増殖因子（EGF）を含む無血清培地に代えさらに培養を継続した。他の多くの薬物も無血清培地に代えた時点で添加した。肝実質細胞の増殖能は、以下に示すようにDNA合成活性と核数の変化によって評価した（growth assessment）。

5-2) DNA合成能の測定

Morley と Kingdon の方法により、³H]チミジンの肝実質細胞のDNA画分への取り込み量をもって定量した⁹⁾。特異的DNA合成量は、アフィジコリン（10 μg/ml）存在下でのDNA合成量を差し引いて求め、肝実質細胞のタンパク量当りで示した。

5-3) 核数の計測

肝実質細胞は、培養によりコラーゲンコートした培養皿に強固に接着するため、通常の酵素処理によっては、均一に分散させることが困難である。そこで、細胞数の増加を核数の増加をもって代用することにした。核数の計測は、肝実質細胞の細胞膜を可溶化して核を均一に分散させるという Nakamura らの方法⁸⁾を一部改変して行なった。

6. 結 果

我々は、成熟ラットの肝実質細胞をインスリンまたは上皮増殖因子（EGF）の存在下で培養するとアドレナリン作動性 β_2 および α_2 応答能が発現してくることをすでに報告した^{10, 11)}。 β_2 および α_2 受容体はそれぞれ、GsおよびGiタンパク質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化および抑制する働きがある。アデニル酸シクラーゼにより生成するサイクリックAMP（cAMP）の肝実質細胞の増殖に対する作用については、互いに矛盾するデータが報告されていて定説を見ていない¹²⁻¹⁴⁾。そこで、我々は、「成長因子は、それ自体が細胞増殖を促進するが、この作用に加えて β_2 （または α_2 ）応答能を発現させ、その受容体刺激の効果も同時に利用して肝細胞の増殖をさらに増強（または抑

制) させる」という作業仮説を立てて、これを検証することにした。

図2には、血清含有ウィリアムスE培地で3時間肝実質細胞を培養しディッシュに接着させ、その後、無血清培地でEGFの有無でさらに4時間培養した時の位相差顕微鏡写真を示した。対照(EGF無添加)と比較して、20ng/ml EGF添加培養によって細胞数(核数)が明らかに増加していた。

図3Aには、EGFによる肝実質細胞の増殖促進作用の経時変化を示した。血清含有培地から、無血清培地に代えて20ng/ml EGFを添加したところ肝実質細胞のDNA合成能は、3.0時間で有意

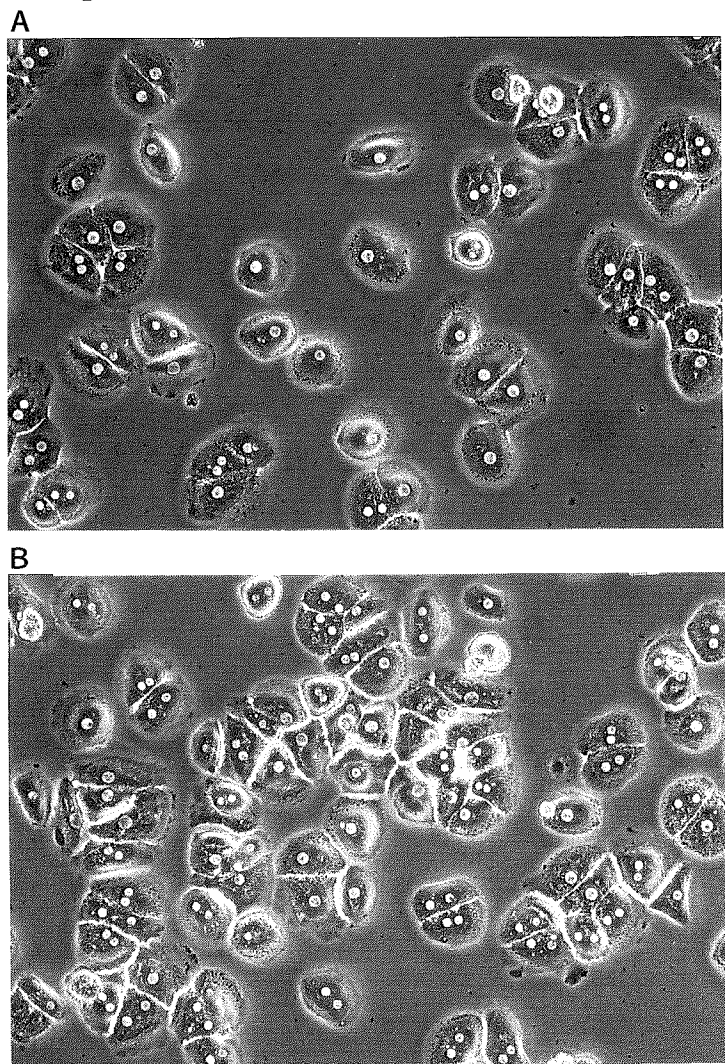


図2 初代培養肝細胞に対するEGFの増殖促進作用：顕微鏡写真

撮影倍率×200

Seeding 密度： 3.3×10^4 cells/cm²

薬物処理：A) Control (成長因子無添加)、B) EGF、20ng/ml

培養時間：培地交換後 4h

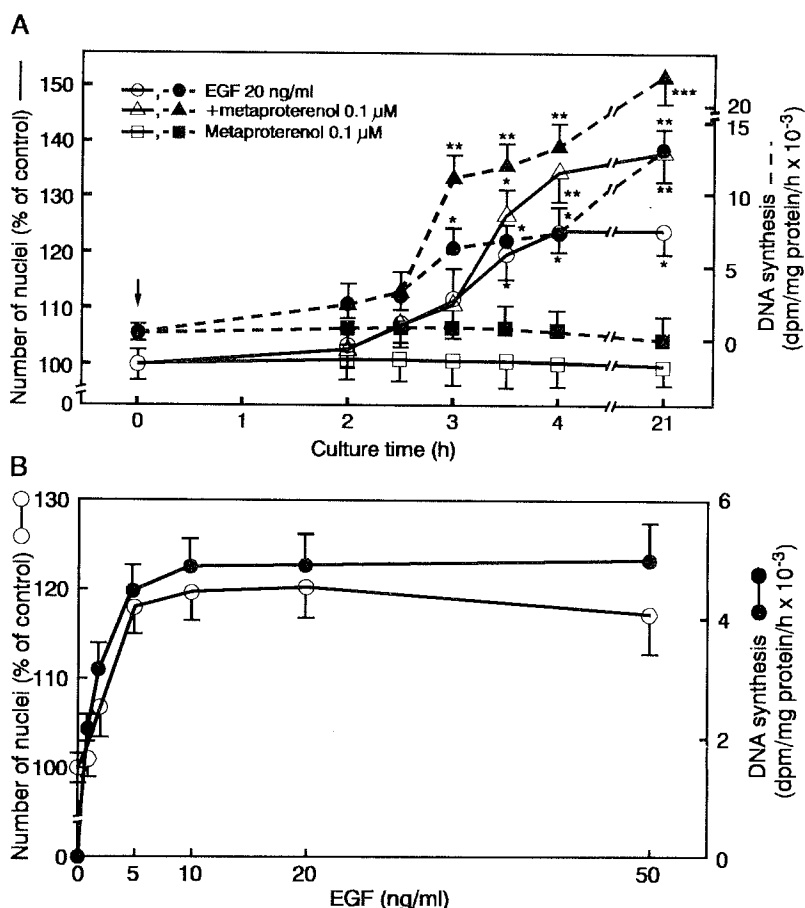


図3 初代培養肝細胞に対する EGF の増殖促進作用の経時変化および用量反応関係

Seeding 密度: 3.3×10^4 cells/cm²

A) 経時変化: EGF, 20ng/ml ± metaprotenerol, 0.1 μM で培地交換後、種々の時間さらに培養

有意差: control (EGF 添加直後) に対する有意差、* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

(mean ± S.E.M. (n = 3))

B) 用量反応関係: 培地交換後 4 h の各種の EGF で培養

EC₅₀: 3 ng/ml、mean ± S.E.M. (n = 3)

に増加し、3.5時間後には、核数が有意に増加することを見出した。無血清培養 4~21時間で DNA 合成、核数の増加とも最大となった。 β_2 作動薬のメタプロテレノール (10^{-7} M) は、単独では、DNA 合成能や核数に有意な影響を与えなかったが、EGF の肝実質細胞増殖効果を増強させることが明らかとなった。したがって、EGF は、増殖促進薬 (mitogen) であり、メタプロテレノール

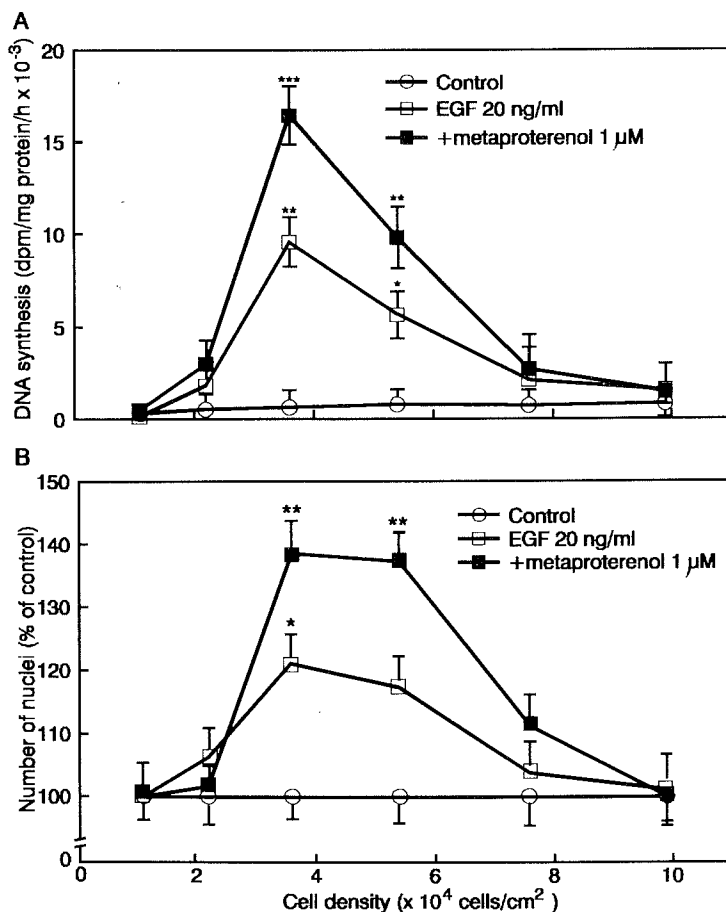


図4 初代培養肝細胞における EGF の増殖促進作用に対する培養時細胞密度の影響

薬物処理: EGF、20ng/ml; metaprotegerin, 1 μM

培養時間: 培地交換後 4 h

有意差: control (成長因子無添加) に対する有意差、* $P < 0.05$,

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, mean \pm S.E.M. (n = 3)

は、増殖修飾薬 (comitogen) であるということが出来る (なお、EGF による β_2 応答能の発現あるいは、早期の増殖開始についての詳細は、原著論文を参照されたい)⁴⁾。図 3 B には、EGF の増殖促進作用の用量-反応関係を示した。EGF の用量 (1~50ng/ml) に依存して、DNA 合成能および核数は増加し、最大反応は EGF の 10ng/ml 付近で得られた。ED₅₀ 値は、両反応とも 3 ng/ml と一致しており、EGF はきわめて微量でも強力な肝実質細胞増殖促進効果を示した。

図 4 には、20ng/ml EGF の肝実質細胞の DNA 合成能(A)および核数の変化(B)に対する播種時の細胞密度の影響を示した。EGF は、低密度領域 ($\sim 3.3 \times 10^4$ 個/cm²) では、細胞密度に依存して

両反応を促進させ、 3.3×10^4 個/cm²で最大となりそれ以上の高密度領域 (7.5×10^4 個/cm²～) では、EGF の効果は減弱ないし完全に消失することを見出した。メタプロテレノールは、EGF の効果を低密度側で増強したが、高密度側では、増強効果が減弱ないし消失した。現時点で細胞増殖に関する密度依存性のメカニズムは不明であるが、追究するに値する興味深いテーマと思われる。

図 5 では、EGF のもたらす肝実質細胞増殖作用に関与していると考えられるシグナル伝達因子を薬理的に決定することを試みた。この目的のために、シグナル伝達因子の特異的阻害薬は、利

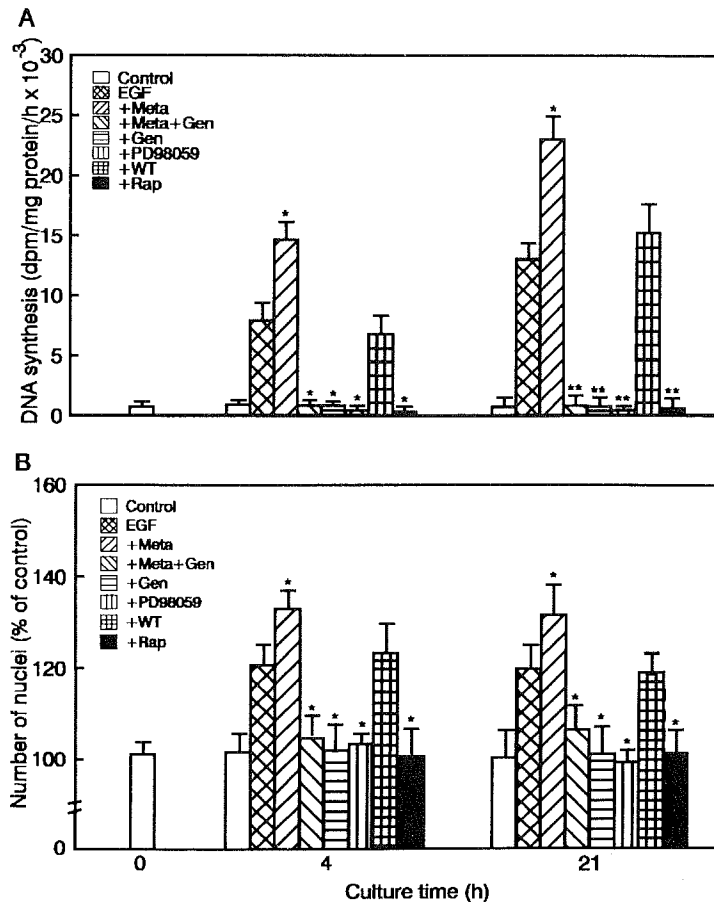


図 5 初代培養肝細胞における EGF の増殖促進作用に対する特異的情報伝達因子抑制薬の効果

Seeding 密度: 3.3×10^4 cell/cm²

薬物処理: EGF、20ng/ml; Meta, metaproterenol (10^{-6} M); Gen, genistein (5×10^{-6} M); PD98059 (3×10^{-5} M); WT, wortmannin (10^{-7} M); Rap, rapamycin (10ng/ml)

培養時間: 培地交換後 4 h および 21 h

有意差: EGF 単独処理群に対する有意差、* $P < 0.05$ (mean \pm S. E. M. (n = 3))

用できる有力な手段である。本実験では、ゲニスチン（チロシンキナーゼ阻害薬）¹⁵⁾、ワートマニン（ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ阻害薬）¹⁶⁾、PD98059 (MAP キナーゼキナーゼ阻害薬)¹⁷⁾、ラパマイシン (P70S6 キナーゼ阻害薬)¹⁸⁾ を使用した。その結果、ゲニスチン、PD98059、ラパマイシンは、20ng/ml EGF の肝実質細胞増殖作用を完全に抑制したが、ワートマニン (10^{-7} M) は、無効であった。したがって、チロシンキナーゼ、MAP キナーゼキナーゼ、P70S6 キナーゼは、EGF の肝実質細胞増殖作用のシグナル伝達経路 (signal transduction pathway) において必須の役割を果たしているが、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼは、関与していないものと考えられる。なお、図 5 には示していないが、EGF の効果に対するメタプロテレノールの増強効果は、 β_2 遮断薬のブトキサミンの併用で完全に遮断された。また、メカニズムの異なる他の cAMP 増加薬（例、グルカゴン、フォルスコリン、ジブチリル cAMP）によってもメタプロテレノールの修飾効果を置き換えることができた。また、これらのすべての cAMP 増加薬の効果は、タンパクキナーゼ A の特異的阻害薬 H-89 (10^{-7} M) を併用することにより完全に抑制された。したがって、 β_2 作動薬による EGF の作用の増強効果は、cAMP/タンパクキナーゼ A を介して、EGF のシグナル伝達経路に促進的な影響を与えた結果と考えられる（これらの詳細なデータについては、原著論文を参照されたい）⁴⁾。

以上の実験データをもとにして、EGF の肝実質細胞増殖促進作用に関するシグナル伝達経路と β_2 アドレナリン作動薬による修飾に関する模式図を図 6 に示した。但し、個々のシグナル伝達因

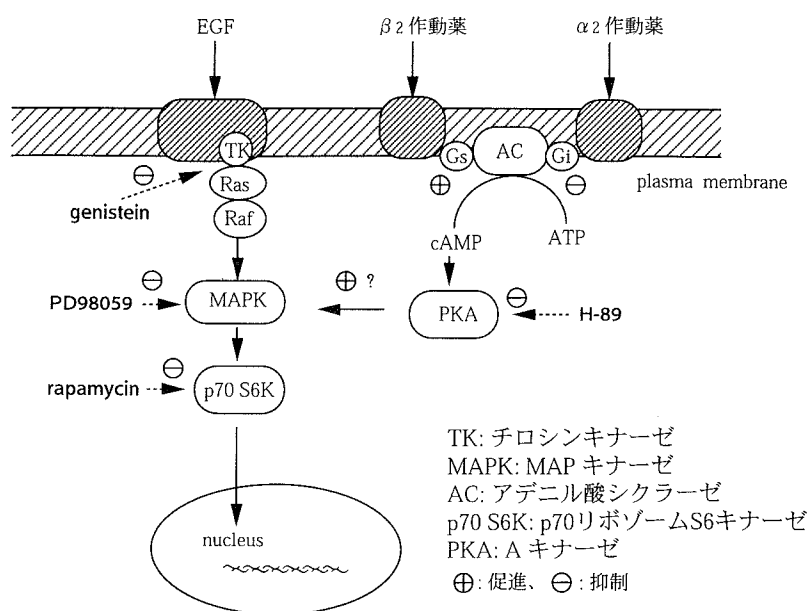


図 6 初代培養肝細胞における EGF の情報伝達機構に対するアドレナリン作動薬の効果

表1 肝細胞の増殖における各成長因子の情報伝達機構

成長因子	促進係	抑制系	情報伝達因子
インスリン	β_2 受容体-cAMP-A キナーゼ	—	RTK・PI3K・MAPK・P70S6K
インスリン様成長因子 I (100ng/ml)	α_1 受容体-PLC-C キナーゼ β_2 受容体-cAMP-A キナーゼ	細胞高密度	RTK・PI3K・MAPK・P70S6K・PLC
肝細胞増殖因子 (5 ng/ml)	α_1 受容体-PLC-C キナーゼ β_2 受容体-cAMP-A キナーゼ	細胞高密度	RTK・PI3K・P70S6K・MAPK・PLC・C キナーゼ
血小板由来増殖因子 (10ng/ml)	α_1 受容体-PLC-C キナーゼ	—	RTK・PI3K・P70S6K・MAPK・PLC・C キナーゼ

RTK：チロシンキナーゼ，PI3K：ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ

MAPK：MAP キナーゼ，PLC：ホスホリパーゼC

子の配列順序（上下関係）については、今回の実験から明らかになったものではなく、文献上のものを参考にして記述した¹⁹⁾。両方のシグナル伝達経路は、in vivo における肝再生時に密接に連動している可能性が考えられる。

本論文では、EGF の場合に限定して肝実質細胞の増殖促進作用のデータを示したが、我々は、同様にしてその他の肝細胞増殖促進因子についても、関与するシグナル伝達因子、細胞密度依存性およびアドレナリン作動薬による修飾について検討を行なっている^{20~23)}。それらの結果のみ表1にまとめた。種々の成長因子間でこれらの要因に関して差異が認められた。しかし、肝実質細胞の増殖を促進させることのできる成長因子の数がなぜこのように多いのか、その生理的意義は不明である。この点について、我々は、これらの成長因子が、肝再生時の異なったタイミングで作用を発揮するのではないかと考えている（後述）。

7. 考 察

本実験から得られた結果を総合して、in vivo における肝再生現象のシナリオ (scenario) を考えてみたい。肝実質細胞の増殖開始には、肝部分切除や肝障害などが最初の刺激となり、局部的に浮腫が起こり細胞をとりまく環境が変化する。そして、肝実質細胞間の接触がルーズになると（低密度の条件）、オートクリン、パラクリンあるいはエンドクリン様式により分泌されたいくつかの増殖促進因子（例、EGF、HGF、IGF-I）が順次肝実質細胞に作用し、DNA 合成を開始させ、細胞分裂期 (M) へと導く。これと平行して、 β_2 （および α_2 ）応答能をも高める。そこに内在性カテコールアミンが働き、肝実質細胞の増殖をより促進（あるいは抑制）させるように修飾する（図1、図6参照）。

その後、細胞数が増加し（高密度の条件）、細胞間の接触が密になると、一種の接触阻害 (contact

inhibition) が起こり、細胞密度に依存性の高い成長因子 (例、EGF、HGF、IGF-I) の作用は終了する。他方、成長因子の中には、肝実質細胞が比較的高密度の状態となっても、なおも増殖作用を示すものがある (例、インスリン、PDGF、IGF-II)²⁰⁻²³⁾。これらの成長因子は、肝再生の比較の後期でも、増殖促進効果を発揮するものと考えられる。そして、肝再生の終了には、細胞密度の条件の他に、抑制性因子の関与が示唆されている。その候補物質としては、腫瘍壊死因子、腫瘍増殖因子- β 、インターロイキン-6 などあげられてる。しかし、抑制性因子の作用機構の研究は、促進性因子のそれに比べてあまり進んでいない。

今後、肝再生の自然な時間経過において、関与する個々の成長促進 (あるいは抑制) 因子の遺伝子の発現、生合成、分泌、作用するタイミングさらには肝実質細胞増殖に対する促進性および抑制性の修飾因子とのクロストーク (cross-talk) の問題を詳しく検討する必要がある。これらにより、肝再生、すなわち臓器の形成、という壮大な生物学現象のメカニズムが解明されることになるものと思われる。

8. 将来の展望

本実験系と実験結果の将来における応用的側面を考えてみたい。今日、生体部分肝移植が医療として盛んに行なわれており、多くの生命が救われている。しかし、劇症肝炎や肝硬変などの重症肝疾患により死に瀕している患者数は、もっと多いのが現実である。これらの患者を救うために、肝移植までの「つなぎ」として、医療使用に耐えるハイブリット型人工肝臓の開発が試みられている。この際、現実利用できるヒトの肝実質細胞の数が少ないという問題があり、その細胞数を人工的に増やしてやる必要がある。この点の解決に、今回の我々の実験結果が貢献するものと思われる。また、抗ウイルス薬のスクリーニングという観点からも、本実験系と得られた結果が有用な情報を提供しているものと考えられる。さらに、種々の成長因子が使用する細胞内シグナルの伝達因子に対する特異的な阻害薬を開発すれば、それが、肝癌の治療薬につながってゆく可能性もある。

次の新しい世紀には、より多くの意欲的な研究者がこれらの課題に取り組んでくれることを期待したい。

9. 謝 辞

本稿執筆の機会を与えて下さいました城西大学生命科学研究センター所長森本雅憲教授、および同センターの先生方に厚く御礼を申し上げます。

<参考文献>

- 1) Michalopoulos, G. K., FASEB J., 4, 176-187 (1990)
- 2) Michalopoulos, G. K., DeFrances, M. C., Science, 276, 60-66 (1997)
- 3) 中村敏一、サイエンス、20, 6-17 (1990)

- 4) Kimura, M., Ogihara, M., *Eur. J. Pharmacol.*, 324, 267-276 (1997)
- 5) Berry, M. N., Friend, D. S., *J. Cell Biol.*, 43, 506-520 (1969)
- 6) Seglen, P. O., *Methods in Cell Biology*, 13, 29-83 (1976)
- 7) McGowan, J. A., Strain, A. J., Buchen, N. L., *J. Cell Physiol.*, 108, 353-363 (1981)
- 8) Nakamura, T., Tomita, Y., Ichihara, A., *J. Biochem.* 94, 1029-1035 (1983)
- 9) Morley, C. G. D., Kingdon, H. S., *Anal. Biochem.*, 45, 298-305 (1972)
- 10) Ogihara, M., *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 752-757 (1996)
- 11) Ogihara, M., *Japan. J. Pharmacol.*, 68, 11-18 (1995)
- 12) Bronstad, G., Christoffersen, T., *FEBS Lett.*, 120, 89-93 (1980)
- 13) Bronstad, G. O., Sand, T. E., Christoffersen, T., *Biochim. Biophys. Acta.*, 763, 58-63 (1983)
- 14) Marker, A. J. et al., *Biochem. Pharmacol.* 44, 1037-1043 (1992)
- 15) Akiyama, T. et al., *J. Biol. Chem.*, 262, 5592-5595 (1987)
- 16) Baggiolini, M. et al., *Exp. Cell Res.*, 169, 408-418 (1987)
- 17) Alessi, D. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 27489-27494 (1995)
- 18) Chung, J. et al., *Cell*, 69, 1227-1236 (1992)
- 19) Davis, R. J., *J. Biol. Chem.*, 268, 14553-14556 (1993)
- 20) Kimura, M., Ogihara, M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 282, 1146-1154 (1997)
- 21) Kimura, M., Ogihara, M., *Eur. J. Pharmacol.*, 327, 87-95 (1997)
- 22) Kimura, M., Ogihara, M., *Japan. J. Pharmacol.*, 76, 165-174 (1998)
- 23) Kimura, M., Ogihara, M., *Eur. J. Pharmacol.*, 354, 271-281 (1998)
- 24) 中村敏一、サイエンス、18, 46-56 (1988)